

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 36 378.8

Anmeldetag: 26. Juli 2001

Anmelder/Inhaber: Norddeutsche Pflanzenzucht Hans-Georg
Lembke KG, 24363 Holtsee/DE

Bezeichnung: Männliche Sterilität in Gräsern der Gattung Lolium

IPC: A 01 H, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 3. November 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hintermeier

München · Hamburg · Düsseldorf

Patentanwälte

Dr. Walter Maiwald (München)

Dr. Volker Hamm (Hamburg)

Dr. Stefan Michalski (Düsseldorf)

Dr. Regina Neuefeind (München)

Dipl.-Ing. Univ. Udo Preuss (München)

Rechtsanwalt

Stephan N. Schneller (München)

In Kooperation mit:

Dr. Schmidt-Felzmann & Kozianka

Rechtsanwälte

(Hamburg)

Parr · Tauche ·

Leutheusser-Schnarrenberger

Rechtsanwälte

(München · Starnberg)

Aktenzeichen
Neuanmeldung

NORDD. PFLANZENZUCHT

Unser Zeichen
N 7130 / RN

München,
26. Juli 2001

NORDD. PFLANZENZUCHT

Hans-Georg Lembke KG

Hohenlieth, 24363 Holtsee

Männliche Sterilität in Gräsern der Gattung *Lolium*

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von stabil männlich sterilen Pflanzen der Gattung *Lolium* zur Verwendung in der gezielten Produktion von Hybridsorten unter Ausnutzung von Heterosis.

Pflanzen besitzen als Eukaryonten zwei oder mehr Kopien ihrer genetischen Information pro Zelle. Jedes Gen wird in der Regel durch zwei Allele, die im homozygoten Zustand identisch bzw. im heterozygoten Zustand unterschiedlich sein können, repräsentiert. Bei der Kreuzung

RN:MH:uh

Postfach 330523 · 80065 München · Elisenhof · Elisenstrasse 3 · 80335 München

Tel. +49 (0)89 74 72 660 · Fax +49 (0)89 77 64 24 · <http://www.maiwald.de> · info@maiwald.de

Geschäftsführer: Dr. Walter Maiwald · Dr. Volker Hamm · Dr. Stefan Michalski · Dr. Regina Neuefeind · HRB Nr. 111307

von zwei ausgewählten Inzuchtlinien sind die in der ersten Generation gebildeten F₁-Hybriden, also heterozygote Individuen, häufig größer, robuster und auch ertragreicher als die homozygoten Eltern, vermutlich weil ihre beiden allelischen Genprodukte a) mit geringerer Wahrscheinlichkeit inaktiviert werden oder b) eine größere Reaktionsbreite aufweisen. Dieser als Heterosis oder Hybridvitalität bezeichnete Effekt wird bereits seit vielen Jahrzehnten von Pflanzenzüchtern zur Produktion von Hybrid-Sorten genutzt.

Unter dem Phänomen der Heterosis versteht man somit die Steigerung von quantitativen Merkmalsausprägungen in einer Nachkommenschaft über das Elternmittel bzw. über die Leistung des besseren Elters hinaus. Insbesondere die Wüchsigkeit (Pflanzenlänge, Verzweigungsgrad etc.) und der Ertrag sowie quantitativ vererbte Merkmale (u.a. Resistenzen) können hierbei betroffen sein.

Die Züchtung von Hybridlinien erfolgt unter Nutzung der cytoplasmatischen männlichen Sterilität (CMS) oder der Selbst-Inkompatibilität (SI), den beiden wichtigsten genetischen Systemen zur Verhinderung der Selbstbefruchtung. Eine vollständige Nutzung der Heterosis läßt sich durch die Ausnutzung der cytoplasmatisch vererbaren männlichen Sterilität erreichen (C. Bothe, Nutzung von teilfertilen ms-Linien für die Züchtung von Chance-Hybriden bei Welschem Weidelgras (*Lolium multiflorum* Lam.), Dissertation Göttingen, Cuvillier Verlag Göttingen 1996, 113 S.; G. Kobabe, Heterosis and hybrid seed production in fodder grass, Monographs on Theoretical and Applied Genetics, Vol. 6 Heterosis, Hrsg.: R. Frankel, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1983; V. Lein, Heterosis in Kreuzungen zwischen Inzuchtlinien des Deutschen und Welschen Weidelgrases (*Lolium perenne* L. x *Lolium multiflorum* Lam. ssp. *italicum*) Dissertation Göttingen 1988; 91 S.). Durch den Verlust der Fähigkeit eines Kreuzungspartners fertilen Pollen zu bilden, ermöglicht die cytoplasmatische männliche Sterilität eine gezielte Produktion von F₁-Hybriden. Die weibliche Fertilität ist davon nicht betroffen.

In der Züchtung von Kulturpflanzen mit verbesserten agronomischen Leistungen und angepaßten Inhaltsstoffen lassen sich in Abhängigkeit des natürlichen Befruchtungsmodus der jeweiligen Pflanzenart unterschiedliche Zuchtmethoden anwenden. Während bei den strengen Selbstbefruchtern wie z.B. Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Weizen (*Triticum aestivum* L.) Methoden der Linienzüchtung zur Anwendung kommen, wurde bei obligaten Fremdbefruchtern wie dem Roggen (*Secale cereale* L.) in der Vergangenheit Populations-, Synthetic- und Hybridzüchtung angewendet, bei denen in zunehmendem Maße Heterosis genutzt wird.

Das für die Züchtung vorhandene Pflanzenmaterial weist eine natürliche Variabilität in der Ausprägung der Heterosis auf. Hierbei unterscheidet man die allgemeine Kombinations-eignung (general combining ability, GCA) und die spezielle Kombinationseignung (specific combining ability, SCA). Linien mit einer hohen GCA zeichnen sich durch eine hohe heterotische Leistung in Kreuzungen mit unterschiedlichen Elternlinien aus. Pflanzenlinien mit einer hohen SCA weisen eine hohe heterotische Leistung in Kombination mit einem speziellen Kreuzungspartner auf. Die SCA kann somit nur in vergleichenden paarweisen Kreuzungen (z.B. Diallel) ermittelt werden.

Für die züchterische Arbeit im Hinblick auf die Nutzung von Heterosis wird i.d.R. Pflanzenmaterial selektiert, welches sich durch eine gute Eigenleistung und eine gute GCA bzw. SCA auszeichnet.

Während bei der Züchtung von Populationssorten zunächst Massenauslese, d.h. wiederholte Auslese der besten Einzelpflanzen und gemeinsame Weiterführung zu einer homogenen Sorte, betrieben wird, werden für die Erzeugung sog. synthetischer Sorten (Synthetics) mehrere Linien, die sich durch eine gute GCA ausweisen, selektiert. Zur Saatguterzeugung werden dann gezielt verschiedene Linien gemeinsam über zwei bis drei Generationen bis zur Vermarktung als Saatgut angebaut. Diese Synthetics weisen i.d.R. ein höheres Maß an Heterosis und somit insbesondere eine höhere Ertragsleistung als die Populationssorten auf.

Hybridsorten stellen eine weitere Steigerung bei der Nutzung von Heterosis in Pflanzensorten dar. Durch die gezielte Kombination von bestimmten Elternlinien mit guter GCA bzw. SCA im letzten Schritt der Saatguterzeugung können Hybridsorten erzeugt werden, die sich durch eine sehr hohe Heterosisleistung und somit durch ein deutlich gesteigertes Ertragspotential auszeichnen.

Voraussetzung zur Erzeugung von Hybridsorten ist die gezielte Bestäubung einer Mutterlinie mit einer ausgewählten Vaterlinie als Pollenspender. Um ausreichende Mengen an Saatgut zu erzeugen, muß dieser letzte Schritt im großen Maßstab unter Freilandbedingungen erfolgen. Durch Anbau einer pollenlosen, d.h. männlich sterilen Mutterlinie und einer in direkter räumlicher Nähe angebauten fertilen (pollentragenden) Vaterlinie wird eine derartige gelenkte Bestäubung herbeigeführt. Dabei entstehen in großem Umfang Hybridsamen, die ausschließlich auf die Kreuzungskombination der beiden Elternlinien zurückgehen. Voraussetzung hierfür ist insbesondere das Vorhandensein einer vollständig, d.h. möglichst 100%ig männlich sterilen Mutterlinie, die sich nicht selbst bestäuben kann.

Aus diesem Grunde wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden, insbesondere mechanische, chemische und genetische Verfahren zur Induktion von männlicher Sterilität von Pflanzen entwickelt. Mechanische Methoden, wie beispielsweise das Entfernen der Antheren, kommen nur bei Pflanzenarten mit großen und/oder räumlich getrennten Geschlechtsorganen, wie z.B. dem Mais (*Zea mays* L.), in Frage. Zur chemischen Emaskulation von Pflanzen wurden als Gametozide bezeichnete Substanzen entwickelt, die nach Applikation pollenabtötend wirken. Auf diesem Wege konnte auch bei strengen Selbstbefruchtern wie Weizen und Gerste erstmals Hybridsorten erzeugt werden.

Genetische Mechanismen, die männliche Sterilität von Pflanzen induzieren, sind bereits seit langem beschrieben. So treten grundsätzlich männlich sterile Pflanzen in den zumeist

aneuploiden Nachkommenschaften von weiten, d.h. interspezifischen oder intergenerischen Kreuzungen auf. Dies ist z.T. auf Unregelmäßigkeiten in der Meiose der Nachkommenschaft zurückzuführen und betrifft die männlichen und weiblichen Gameten gleichermaßen. Daneben wurden aber auch Systeme entdeckt und weiterentwickelt, die auf einzelnen Gendefekten beruhen und ausschließlich die männlichen Gameten bzw. den Pollen beeinflussen. Solche Systeme gehen einerseits auf Mutationen im Kerngenom (nuclear male sterility, NMS) und andererseits auf Genveränderungen im Plastom bzw. Cytoplasma (cytoplasmatic male sterility, CMS) zurück.

Die CMS beruht im Prinzip auf einer Inkompatibilität zwischen Zellkern und Cytoplasma und wird bei den meisten höheren Pflanzen strikt maternal vererbt (U. Witt, Identifikation und Charakterisierung eines kernkodierten Mitochondrienproteins aus dem pollensterilitäts-induzierenden Polima-Cytoplasma von *Brassica napus* L., Dissertation, Hamburg 1993.).

Unter Zuhilfenahme einer entsprechenden Vaterlinie, die die Sterilität des mütterlichen Cytoplasmas nicht aufzuheben vermag (sog. 'Maintainer'), kann theoretisch nach mehrmaliger Rückkreuzung mit der Maintainerpflanze eine reinerbige, sterile CMS-Pflanze erzeugt werden. Ein vollständiges CMS-System beispielsweise zur Erzeugung von Hybridsaatgut bei Gräsern, deren vegetative Masse genutzt wird, besteht demzufolge aus folgenden Komponenten:

1. der CMS-Linie, die ein sterilitätsinduzierendes Cytoplasma (S) trägt, auch sterile Mutterlinie genannt.
2. der Maintainer-Linie, die normal fertiles Cytoplasma (N) trägt und der CMS-Linie ansonsten sehr ähnlich ist.
3. der Bestäuber- oder Vaterlinie, die normal fertil ist und eine gute Kombinationseignung zur CMS-Mutterlinie besitzt.

Ein grundlegendes technisches Problem bei der Erzeugung von Hybridsorten stellt die Stabilität der männlichen Sterilität der CMS-Linie dar. Dies betrifft insbesondere die 100%ige Weitergabe der männlichen Sterilität in die nächste Generation nach erfolgter Kreuzung und die Bereitstellung eines umweltunabhängigen Phänotyps in Form von männlich sterilen Pflanzen. Nur unter diesen Bedingungen können agronomisch optimierte und vollständig männlich sterile Mutterpflanzen erzeugt werden, die es ermöglichen, Heterosis in Form von Hybridsorten in vollem Umfang zu nutzen und ein zusätzliches Ertragspotential zu realisieren.

Die *Lolium*-Arten Deutsches Weidelgras (*Lolium perenne* L.), Welsches Weidelgras (*Lolium multiflorum* L.) und Bastardweidelgras (*Lolium hybridum* L.) sind die bedeutendsten Grasarten im europäischen Futtergrasanbau. Bei Futtergräsern wird in der zielgerichteten Ausnutzung von Heterosiseffekten eine reale Möglichkeit zu einer wesentlichen Erhöhung des Ertragspotentials und zur Verbesserung weiterer quantitativer Eigenschaften wie Stresstoleranzen gegen biotische und abiotische Faktoren gesehen. Da die vorstehend genannten *Lolium*-Arten Fremdbefruchter sind, bietet sich zu diesem Zweck die Züchtung von Synthetics und Hybridsorten an.

Um zusätzlich Variabilität als Ausgangsbasis zur Selektion neuer Genotypen zu erlangen, wird in der Züchtung von Kulturpflanzen das Verfahren der Polyploidisierung genutzt. Bei der Polyploidisierung wird durch den Einsatz von Mitosehemmern wie Colchicin während der Mitose eine Aufdoppelung des Chromosomensatzes einer Zelle bewirkt. Dies hat bei *Lolium*-Arten zur Folge, daß aus den ursprünglich diploiden Arten ($2n = 2x = 14$) tetraploide Formen erzeugt werden, die einen doppelten Chromosomensatz besitzen ($2n = 4x = 28$). Da Tetraploide andere Eigenschaften als Diploide aufweisen, wurden für die wirtschaftlich relevanten *Lolium*-Arten *L. perenne*, *L. multiflorum* und *L. hybridum* entsprechende tetraploide Sorten gezüchtet.

Für die Weidelgrasarten gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die auf Heterosis und Hybridwüchsigkeit in allen Ploidiestufen hinweisen (u.a. C. A. Foster, Interpopulational and intervarietal hybridization in *Lolium perenne* breeding, heterosis under noncompetitive conditions, J. Agric. Sci. 1971, 107-130; C. A. Foster, (1973): Interpopulational and intervarietal F₁-Hybrids in *Lolium perenne*: performance in field sward conditons, J. Agric. Sci 1973, 80, 463-477; I. Rod, Beitrag zu den methodischen Fragen der Heterosiszüchtung bei Futtergräsern, Ber. Arbeitstagung Arbeitsgemeinsch. Saatzuchtleiter Gumpenstein 1965, S. 235-252; I. Rod, Remarks on heterosis with grasses, Heterosis in plant breeding, Proc. 7 th Congr. Eucarpia Budapest (1967), S. 227-235; A. J. Wright, A theoretical apprasial of relative merits of 50% hybrid and synthetic, J. Agric. Sci 79, 1972, S. 245-247). Insbesondere konnten in der Vergangenheit nach Einzelpflanzen-, Linien- und Sortenkreuzungen Heterosis-effekte festgestellt werden (Kobabe, siehe oben).

Die gegenwärtig am häufigsten angewandte Zuchtmethode, nämlich die Erzeugung von Synthetics oder Sorten auf Klon- oder Populationsbasis, wurde 1940 von Frandsen (N. H. Frandsen, Some breeding experiments with timothy, Imp. Agric. Bur. Joint Publ. 1940, 3, 80-92) bei Gräsern entwickelt. Dieses Verfahren ermöglicht allerdings wie vorstehend erwähnt nur eine teilweise Nutzung der Heterosis. Eine echte Futtergras-Hybridsorte durch Verwendung einer *Lolium*-Linie mit cytoplasmatischer männlicher Sterilität zur vollständigen Nutzung der Heterosis (C. Bothe, siehe oben; G. Kobabe, siehe oben; V. Lein, siehe oben) ist bisher nicht bekannt, da keine Pflanzen mit vollständiger männlicher Sterilität zur Verfügung standen und die bekannten CMS-Quellen instabil sind.

Die bei den *Lolium*-Arten gefundenen bzw. angewendeten Systeme zur Erlangung der männlichen Sterilität unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Entstehung und Wirkungsweise. Systeme mit mechanischer Kontrolle zur Kastration der Pflanzen scheiden bei den *Lolium*-Arten morphologiebedingt aus. Chemische Methoden wurden bislang bei *Lolium* nicht entwickelt, während genetische Kontrollmechanismen bereits vor geraumer Zeit beschrieben

wurden. Über spontan entstandene Quellen wird bei *Lolium multiflorum* von Nitzsche (Cytoplasmatische männliche Sterilität bei Weidelgras (*Lolium ssp.*) Z. Pflanzenzücht., Berlin (West) 65, (1971), S. 206-220) und bei *Lolium perenne* von Gaue (Möglichkeiten der Hybridzüchtung auf ms-Basis bei *Lolium perenne* L. XIII. Internat. Grasland-Kongreß, Leipzig 1977, Sektionsvortrag 1-2, S. 491-496; Ergebnisse von Untersuchungen zur Hybridzüchtung bei *Lolium perenne* Tag.-Ber., Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR, Berlin (1981) 191, S. 119-126) berichtet. Nach Art- und Gattungskreuzungen entstanden ebenfalls bei *Lolium perenne* männlich sterile Formen (F. Wit, Cytoplasmic male sterility in ryegrasses (*Lolium ssp.*) detected after intergeneric hybridization, Euphytica 1974, 23, 31-38; V. Connolly, Hybrid grasses varieties for the future Farm Food Res. 1978, 9, 6, 131-132; V. Connolly, R. Wright-Turner, Induction of cytoplasmic male-sterility into ryegrass (*Lolium perenne*), Theor. Appl. Genet. 1984, 68, 449-453). Keines dieser genetischen Systeme konnte allerdings geno- und phänotypisch stabilisiert werden, so daß bislang kein funktionsfähiges Hybridsystem in den verschiedenen Weidelgrasarten bekannt ist.

Obwohl an der Erzeugung von Hybridlinien mit verbesserten agronomischen Eigenschaften intensiv geforscht wird, führen die bisher zur Erzeugung von männlich sterilen Pflanzen zur Verfügung stehenden Verfahren jedoch in vielen Fällen nicht zu voll befriedigenden Ergebnissen. Es besteht somit ein starkes Bedürfnis nach einem Verfahren zur Erzeugung von vollständig männlich sterilen und stabilen Pflanzen, welche die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweisen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Herstellung von stabilen, d.h. u.a. umweltunabhängigen und vollständig, d.h. zu 100% männlich sterile Pflanzen der Gattung *Lolium* zur Verfügung zu stellen, die es ermöglichen, gezielt Hybridpflanzen zu erzeugen und damit Heterosiseffekte wie beispielsweise ein zusätzliches Ertragspotential auszunutzen.

Diese und weitere Aufgaben der Erfindung werden durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren bereitgestellt, mit dem es jetzt erstmals möglich ist, vollständig, d.h. zu 100% männlich sterile Pflanzen der Gattung *Lolium* (im folgenden auch als MSL oder MSL-Pflanze (männliche Sterilität *Lolium*) bezeichnet) herzustellen. Diese völlig neuartige Pflanze der Gattung *Lolium* zeichnet sich durch eine hohe Stabilität des sterilitätsverursachenden Plasmas aus. Insbesondere ist die bei den durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten Pflanzen erzeugte männliche Sterilität temperaturstabil und weist nur eine äußerst geringe Umweltabhängigkeit auf. Im Gegensatz zu bisher bekannten sterilen Kreuzungsnachkommen von Pflanzen mit männlicher Sterilität, bei denen ein hoher Anteil an teilsterilen Pflanzen in Abhängigkeit von der Antherenausprägung vorliegt, ist der Sterilitätsgrad bei MSL unabhängig von der Antherenausprägung gleichmäßig hoch (Tabellen 2 bis 4). Die durch das erfindungsgemäße Verfahren erzeugten MSL-Linien ermöglichen folglich erstmals die Produktion von homogenen *Lolium*-F₁-Hybridsorten unter Freilandbedingungen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von vollständig männlich sterilen Pflanzen der Gattung *Lolium* umfaßt die folgenden Schritte:

- a) Mutagenese von Samenmaterial von Wildtyppflanzen der Gattung *Lolium*;
- b) gegebenenfalls Untersuchung der mutagenisierten *Lolium*-Pflanzen mit auf die Pollenvitalität gerichteten Testmethoden und/oder mit molekularbiologischen Methoden; und
- c) Identifizierung von vollständig männlich sterilen *Lolium*-Pflanzen.

Unter Wildtyppflanzen werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung natürlich vorkommende Pflanzen der Gattung *Lolium* verstanden, insbesondere solche, deren Erbmaterial nicht durch Mutagenese manipuliert wurde. Bei dem Samenmaterial handelt es sich insbesondere um Karyopsenmaterial.

Die Mutagenese in Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt vorzugsweise durch Behandlung des Samenmaterials mit chemischen Mutagenen. Besonders bevorzugt wird N-Ethylharnstoff zu diesem Zweck eingesetzt. Weitere denkbare Mutagene sind alkylierende Agenzien wie Methylmethansulfonat und Diepoxybutan, Urethane, Nitrosoverbindungen, Alkaloide wie Colchicin, Peroxide wie H_2O_2 , Alkylperoxide und dergleichen.

Bei einer alternativen Ausführungsform erfolgt die Mutagenese durch Bestrahlung des Samenmaterials mit kurzwelliger UV-Strahlung (z.B. 254 nm); langwelliger UV-Strahlung (z.B. 300 bis 400 nm) in Kombination mit Psoralenen; ionisierender Strahlung wie Röntgen- und γ -Strahlung; und dergleichen.

Die *Lolium*-Pflanzen, in denen die cytoplasmatische männliche Sterilität erzeugt wird, werden vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* und *Lolium hybridum*.

Die Untersuchung der mutagenisierten *Lolium*-Pflanzen mit auf die Pollenvitalität gerichteten Testmethoden dient der Differenzierung von fertilem und dem gewünschten sterilen Pollen. Aufgrund der guten Übereinstimmung zwischen Antherenausprägung und Sterilitätsgrad - 99% der durch das erfindungsgemäße Verfahren erzeugten Pflanzen, die visuell als steril eingestuft worden sind, sind tatsächlich vollsteril - sind Pollenvitalitätsuntersuchungen bei dem erfindungsgemäßen Verfahren lediglich erforderlich, falls eine Kontrolle gewünscht ist. Bei den aus dem Stand der Technik bekannten Pflanzen mit männlicher Sterilität ist dagegen keine sichere visuelle Bewertung der erzeugten männlichen Sterilität möglich, da dort keine bzw. nur eine geringe Übereinstimmung zwischen Antherenausprägung und Sterilitätsgrad vorliegt (Tabelle 3).

Vorzugsweise sind die Testmethoden Färbemethoden, wie beispielsweise die Methode nach Alexander (M.P. Alexander, Differential staining of aborted and nonaborted pollen, Stain Technology 1969, 44/3, 117-122), die Zugabe von Lichtgrünreagenz (I. Šinska, Ergebnisse der Forschung der Pollensterilität der Luzerne d'Eucarpia-Groupe Medicago sativa Piestany 17.-21.5.1976) und die Zugabe von Lugolscher Lösung. Die entsprechenden Reagenzien für die vorstehend genannten Färbemethoden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Alternativ oder ergänzend zu den vorstehend beschriebenen Untersuchungen der mutagenisierten *Lolium*-Pflanzen auf Pollenvitalität beispielsweise durch visuelle Pollenbonitur oder Färbemethoden können molekularbiologischen Methoden zur sicheren genotypischen Differenzierung von MSL gegenüber *Lolium*-Pflanzen eingesetzt werden, die keine vollständige männliche Sterilität aufweisen. Besonders bevorzugt erfolgt die molekularbiologische Differenzierung durch Southern-Blot-Techniken.

Primerpaare zur Amplifizierung der bei der Southern-Blot-Hybridisierung eingesetzten Sonden werden vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den folgenden Primerpaaren (siehe auch Tabelle 6):

- a) TTACTTCACATAGCTTTTCGTU und
CCACAAACCACAAGGATATAG;
- b) CGTAAAGGCATGATTAGTTCC und
GATTGTTCTAAAATGGTTATTCCTC;
- c) ATGATTGAATCTCAGAGGCAT und
CATATACCTCCCCACCAATAG;
- d) TTAGTAGATCGTGAGTGGGTC und
GTGCTAAAAATCCGGTACAT;
- e) TTATCCGTCGCTACGCTGTTC und
AATGGAAAGATCGGAACATGG;
- f) ATGTTTCCACTCAATTTTCAT und

GCTCCACAGTGGTAAAGTCT;

- g) TTACGACCACTGAACAAACTT und
TTTAACCATAAAATCGATTATGC;
- h) CTATATTTTCGTACGTTTCGGA und
TTATTATGGTAAATTTGTGTATCAA;
- i) ATGACTATAAGGAACCAACGA und
GATCAGTCTCATCCGTGTAA;
- j) ATGAGACGACTTTTTCTTGAA und
CTTGTAATACTAATCGAGACCG;
- k) Primerpaare entsprechend den in a) bis j) angegebenen Primerpaaren, wobei sich die jeweiligen Primersequenzen von den in a) bis j) angegebenen Sequenzen um jeweils höchstens 3 Basen unterscheiden, sowie
- l) Primerpaare entsprechend den in a) bis k) angegebenen Primerpaaren, wobei die jeweiligen Primersequenzen die in a) bis k) angegebenen Sequenzen umfassen, wobei die Sequenzen in 5'-3'-Richtung angegeben sind und jeweils die erste Sequenz den oberen Primer darstellt.

Für die Southern-Blot-Hybridisierung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren bevorzugte Restriktionsenzyme werden ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus *HindIII*, *XbaI*, *DraI*, *EcoRV*, *BamHI* und *HaeIII*.

Mit Hilfe von Kombinationen der vorstehend beschriebenen Sonden und Enzyme, insbesondere durch Kombination der Sonde *nad9* (siehe Tabelle 6) mit dem Restriktionsenzym *DraI* ist es möglich, Pflanzen mit stabiler und instabiler männlicher Sterilität bzw. vollständiger und nicht vollständiger männlicher Sterilität eindeutig zu unterscheiden.

Bei einem weiteren wesentlichen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Pflanzen der Gattung *Lolium* mit vollständiger männlicher Sterilität bereitgestellt, die gemäß dem vorstehend beschriebenen Verfahren herstellbar sind.

Ferner ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von stabilen F₁-Hybriden vollständig männlich steriler Pflanzen der entsprechenden *Lolium*-Art, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Herstellung von vollständig männlich sterilen Pflanzen der entsprechenden *Lolium*-Art (MSL-Pflanzen) gemäß dem vorstehend beschriebenen Verfahren, und
- b) Rückkreuzung der in Schritt a) erhaltenen MSL-Pflanzen mit Pflanzen der gleichen *Lolium*-Art, die ein normal fertiles Cytoplasma tragen und die Sterilität der MSL-Pflanzen nicht aufheben (Maintainer-Pflanzen).

In natürlichen *Lolium*-Populationen liegt ein differenzierter Anteil an Maintainer-Pflanzen vor, der durch entsprechende Testkreuzungen mit Überprüfung der F₁-Generation auf Sterilität ermittelt wird.

Eine stabile MSL-Linie wird vorzugsweise durch mehrfache Rückkreuzung mit Maintainer-Linien erhalten.

Das sterilitätsinduzierende Plasma der diploiden MSL-Linie wird bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung durch Polyploidisierung in die tetraploide Genomstufe gebracht. Die Merkmalsausprägung auf tetraploider Stufe ist analog der diploiden Stufe.

Die Polyploidisierung erfolgt durch Behandlung der MSL-Pflanzen mit Mitosehemmern wie beispielsweise Chalon, Colchicin, Narcotin, Chinon und dergleichen. Besonders bevorzugt erfolgt die Polyploidisierung durch Behandlung mit Colchicin.

Beispielsweise liegen in *L. perenne* und *L. multiflorum* sowohl tetraploide als auch diploide Formen vor. Da die Art *L. hybridum* eine direkte Kreuzung der beiden vorstehend genannten Arten darstellt, ist das MSL-System auch in dieser Art in beiden Genomstufen nutzbar.

Ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind stabile MSL-Linien von vollständig männlich sterilen Pflanzen der Gattung *Lolium*, die nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellt worden sind.

Des weiteren ist durch Kreuzungen eine Übertragung des *Lolium perenne*-MSL-Plasmas auf *Lolium*-Arten wie *Lolium hybridum* und *Lolium multiflorum* möglich. Somit wird durch die vorliegende Erfindung die Möglichkeit bereitgestellt, bei genannten *Lolium*-Arten Hybridpflanzen auf der Basis einer *Lolium*-Linie mit stabiler und vollständiger männlicher Sterilität zu erzeugen.

Sowohl Maintainer, MSL-Linie und Bestäuber (= fertile Vaterlinie, die zur Erzeugung der F₁-Hybride genutzt wird) sind vorzugsweise bei *L. perenne* und *L. multiflorum* von der selben Art. Da *L. hybridum* per se eine Kombination der beiden erstgenannten Arten darstellt, können alle drei Komponenten (Maintainer, MSL-Linie und Bestäuber) jeweils aus den beiden Grundarten kombiniert werden. Maintainer können nach herkömmlichen Techniken aus käuflichen Sorten und Zuchtstämmen isoliert bzw. entwickelt werden. Der Bestäuber kann beliebig gewählt werden, da die Fertilität der eigentlichen F₁-Hybride keine Rolle spielt, weil bei Futtergräsern nur die vegetative Masse genutzt wird.

Durch die erfindungsgemäßen Verfahren konnten somit MSL-Linien hergestellt werden, die im Vergleich zu bisher bekannten männlich sterilen *Lolium*-Pflanzen einen hohen Grad an männlicher Sterilität und Stabilität aufweisen und sich somit substantiell von diesen unterscheiden. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen MSL-Linien ist es damit erstmals möglich, F₁-

Hybridsorten von *Lolium*-Arten, insbesondere der Futtergrasarten *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* und *Lolium hybridum* zu erzeugen.

Des weiteren wird durch die vorliegende Erfindung erstmals ein Verfahren bereitgestellt, mit dem MSL-Pflanzen durch Southern Blot-Hybridsierung anhand des Hybridsierungsmusters von *Lolium*-Pflanzen mit teilweiser oder instabiler männlicher Sterilität unterschieden werden können.

Die vorliegende Erfindung wird in den nachfolgenden Beispielen veranschaulicht, ohne sie in irgendeiner Weise einzuschränken.

Beispiele

Beispiel 1:

Mutagenesierung des Karyopsenmaterials von *Lolium*-Pflanzen

Das Ausgangsmaterial für die experimentelle Mutagenese war ein diploider *L. perenne* Wildtyp. Die Karyopsen wurden unter Nutzung des mutagenen Agens N-Ethylharnstoff ($C_3H_8N_2O$) in einer Konzentration von 0,025% für 18 Stunden inkubiert.

Aus den so behandelten 20.000 *L. perenne*-Einzelsamen konnten 1200 potentiell mutierte Einzelpflanzen (erste Generation nach Mutagenese = M_1) angezogen werden. Die restlichen Karyopsen keimten entweder nicht aus oder die Keimlinge waren nicht lebensfähig.

Es folgte eine visuelle Bonitur der 1200 M_1 -Pflanzen auf Pollenschüttung, wobei zunächst 20 Einzelpflanzen als steril eingeordnet wurden. Die so vorselektierten Einzelpflanzen wurden dann drei verschiedenen, auf die Pollenvitalität gerichteten Testverfahren unterzogen (siehe Tabelle 1): 1. Methode nach Alexander (siehe oben), 2. Lichtgrünreagenz (Šinska, siehe

oben), 3. Lugolsche Lösung. Nach erfolgter Untersuchung wurden 19 Einzelpflanzen als teilsteril und eine Einzelpflanze (M 361) als vollsteril eingestuft.

Basierend auf der vollsterilen Mutante M 361 wurde eine stabile MSL-Linie in diploidem Deutschem Weidelgras durch Rückkreuzung mit Maintainer-Linien entwickelt, die im folgenden mit MSL-19 bezeichnet ist.

Nach erfolgter Polyploidisierung konnte die cytoplasmatische männlichen Sterilität auch in der tetraploiden Stufe etabliert werden. Die tetraploide MSL-Linie ist im folgenden mit MSL-163 bezeichnet.

Durch mehrfache Rückkreuzung gelang eine Übertragung des MSL-Plasmas von *L. perenne* auf *L. multiflorum*. Auch hier wurde MSL-Material in diploider und tetraploider Stufe erzeugt.

Beispiel 2:

Pollenbonitur der Pflanzen

Die Charakterisierung der männlichen Sterilität der erfindungsgemäßen MSL-Linie mit vollständiger cytoplasmatischer männlicher Sterilität erfolgte anhand einer Antheren- und Pollenbonitur und im Vergleich mit bereits bekannten CMS (cytoplasmatic male sterility)-Pflanzen aus *Lolium perenne*. Als direkter Vergleich diente zunächst die *L. perenne* CMS-Linie CMS-1 (D. Burkert, R. Schlenker, Pollensterilität bei *Lolium perenne* L. und *Festuca pratensis* Huds. Wiss. Z. Univ. Rostock math.-naturwiss. R., 1975, 4. 7, 845-850; I. Gaue, Ergebnisse von Untersuchungen zur Hybridzüchtung bei *Lolium perenne* Tag.-Ber., Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR, Berlin (1981) 191, 119-126).

Überraschenderweise war der Sterilitätsgrad der durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten MSL-Linie unabhängig von der Antherenausprägung der einzelnen MSL-Pflanzen gleichmäßig hoch, wobei zudem eine sichere Vererbung des sterilitätsinduzierenden Plasmas bei MSL gefunden wurde (siehe Tabellen 2 bis 4). Das unterscheidet sie von den aus dem Stand der Technik bekannten sterilen Kreuzungsnachkommen der CMS-Quellen.

MSL-19 zeichnete sich durch eine reduzierte Antherengröße ohne lebensfähigen Pollen aus. Letzteres wurde durch die genannten Färbeverfahren ebenfalls nachgewiesen. Die Merkmalsausprägung von MSL auf tetraploider Stufe (MSL-163) war analog der diploiden Stufe.

Neben der CMS-Quelle CMS-1 wurden die Sorte Inca (CMS-I1 bis -I4), welche auf einem CMS-System beruht, sowie Pflanzen von sieben CMS-Herkünften der Landessaatzuchtanstalt Hohenheim (CMS-112, CMS-113, CMS-114, CMS-115, CMS-117, CMS-118, CMS-119) in die fortführenden Untersuchungen einbezogen, um einen Vergleich mit weiteren zur Verfügung stehenden *Lolium*-CMS-Pflanzen zu ermöglichen. Dazu wurde unter zwei verschiedenen Umweltbedingungen, nämlich Gewächshaus und Freiland, Pollen reifer Antheren der Einzelpflanzen CMS-1 (S), CMS-1 (N) sowie, stellvertretend für MSL, die Einzelpflanzen der Linie MSL-163 (S) untersucht und miteinander verglichen. Des weiteren wurde der Pollen der Einzelpflanzen CMS-112 bis -115 sowie CMS-117 bis -119 bonitiert.

a) CMS-1 (S)

Insgesamt wurden 40 Einzelpflanzen CMS-1 (S) untersucht. Dabei wurde gezeigt, daß neben vollkommen sterilen Pflanzen auch semisterile mit Anteilen von fertilem Pollen zwischen 20% und 75% (Abbildung 1A) als auch vollständig fertile Pflanzen (Abbildung 1B) auftraten.

Das unterschiedliche Verhältnis von fertilem und sterilem Pollen bei semisterilen Pflanzen ist höchstwahrscheinlich durch umweltbedingte Faktoren hervorgerufen worden, da Einzel-

pflanzen unter unterschiedlichen Umweltbedingungen einen unterschiedlichen Anteil an fertilem Pollen produzierten. Letzteres bestätigt die Instabilität der Quelle CMS-1.

b) CMS-1 (N)

Von 34 untersuchten Einzelpflanzen CMS-1 (N) wurden 32 als vollständig fertil bonitiert, 2 Einzelpflanzen dagegen als semisteril, d.h. im Quetschpräparat konnten sowohl fertiler als auch steriler Pollen beobachtet werden.

c) MSL-163 (S)

Innerhalb MSL-163 (S) wurden 20 Einzelpflanzen untersucht und alle als vollständig steril bonitiert. Die Stabilität der CMS in dieser Linie könnte auf einem frühen Abbruch der Pollenentwicklung beruhen; anfärbbare Pollenkörner wurden in keinem Fall beobachtet.

d) CMS-112 bis -115, CMS-117 bis CMS-119

Die Pollenbonitur von Einzelpflanzen jeder Herkunft ergab, daß der Pollen der Herkünfte CMS-112, CMS-113, CMS-114, CMS-115, CMS-117, CMS-118 und CMS-119 als semisteril einzustufen ist, d.h. bei allen Pflanzen liegen neben sterilen auch anfärbbare, also fertile Pollenkörner vor. Dies läßt sich, ähnlich wie bei CMS-1 (S), durch eine Instabilität der cytoplasmatischen männlichen Sterilität erklären.

Beispiel 3:

Molekularbiologische Untersuchungen von MSL-Pflanzen und Vergleichspflanzen mit cytoplasmatischer männlicher Sterilität

Ergänzend zu den phänotypischen Daten (Pollenbonitur aus Beispiel 2) wurden zur sicheren genotypischen Unterscheidung von MSL gegenüber bekannten CMS-Systemen in *Lolium* das Verfahren einer Southern-Hybridisierung angewendet.

a) Isolierung von Gesamt-DNA

Die Isolierung der Gesamt-DNA erfolgte im wesentlichen nach Wilkie (Isolation of total genomic DNA. In: M. S. Clark (Hrsg.) Plant Molecular Biology – A Laboratory Manual. 1997, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 3-14). In einem mit flüssigem Stickstoff (LN₂) vorgekühlten Edelstahlzylinder wurden 1 bis 2 g LN₂-gefrorenes Blattmaterial mit einer Kugelschwingmühle (Fa. Retsch, Haan) zu einem feinen Pulver zermahlen und in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt. Danach folgte eine Inkubation in 20 ml 2x CTAB-Puffer im Wasserbad bei 65°C für 90 min und anschließende zweimalige Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v). Nach Zentrifugation bei 5000 x g für 15 min in einem Festwinkelrotor HFA 13.50 (Fa. Heraeus, Hanau) wurde die wäßrige Phase in neue 50 ml-Reaktionsgefäße überführt. Der RNA-Abbau erfolgte durch Zugabe von 1/100 Vol. RNase-Lösung (10 mg/ml) und Inkubation für 30 min bei 37°C. Die DNA-Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 0,7 Vol.-%. Isopropanol und Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde die DNA in 10 ml 76% Ethanol/0,2 M NaOAc überführt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift für 5 min in 2 ml 70% Ethanol auf Eis. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation bei 13000 x g für 4 min (Biofuge 22 R, Fa. Heraeus) pelletiert. Nach Aspiration des überschüssigen EtOH wurde das Pellet bei RT getrocknet und in TE-Puffer gelöst (Volumen ist abhängig von der Pelletgröße). Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260 nm (GeneQuant II, Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg). Alle zur DNA-Isolierung verwendeten Puffer sind in Anhang A aufgeführt.

b) Isolierung von mitochondrialer DNA

Die Isolierung von mtDNA erfolgte in Anlehnung an die Protokolle von Kiang et al. (Cytoplasmic male sterility (CMS) in *Lolium perenne* L.: 1. Development of a diagnostic probe for the male-sterile cytoplasm. Theor Appl Genet 1993, 86, 781-787) und Chase und Pring (Properties of the linear N1 and N2 plasmid-like DNAs from mitochondria of cytoplasmic male-sterile *Sorghum bicolor*. Plant Mol Biol 1986, 6, 53-64). Als Ausgangsmaterial

wurde frische Blattmasse von Gewächshauspflanzen verwendet, die zuvor für 16-20 h mit schwarzer Folie abgedunkelt worden waren. Alle Arbeitsschritte bis zur Mitochondrienlysis wurden bei 4°C durchgeführt. Im ersten Arbeitsschritt wurden 60 g Blattmasse in 400 ml Extraktionspuffer in einem Standmixer (Gastronom GT95, Fa. W. Krannich, Göttingen) zerkleinert, durch 5 Lagen Verbandmull (YPSIGAZE-8-fach, Fa. Holthaus-Medical, Remscheid) gefiltert und anschließend für 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Zentrifugenröhrchen dekantiert und zur Mitochondrienpelletierung erneut für 10 min bei 16000 x g zentrifugiert. Das Mitochondrienpellet wurde anschließend mit Hilfe eines sterilen Haarpinsels in 8 ml DNase-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 8 mg DNase I erfolgte der Abbau der Kern- und Plastiden-DNA (90 min bei 4°C). Im nächsten Schritt wurde die Mitochondriensuspension mit 20 ml Waschpuffer unterschichtet und bei 12000 x g (30 min) zentrifugiert. Es erfolgte eine weitere Resuspension des Pellets in Waschpuffer mit anschließender Zentrifugation.

Die Mitochondrien wurden in 3 ml Lysispuffer unter Zugabe von Proteinase K (100 µg/ml Endkonzentration) und 0.5% SDS bei 37°C (1h) lysiert. Anschließend wurden 3 ml Extraktionspuffer dazugegeben und die Proben bei 65 °C im Wasserbad für 10 min inkubiert. Nach Aliquotierung der Proben (600 µl) in Eppendorf-Reaktionsgefäße (2 ml) erfolgte die Proteinfällung durch Zugabe von 200 µl 5 M Kaliumacetat auf Eis (20 min). Die Proteine wurden durch Zentrifugation der Proben für 5 min bei 13000 U/min pelletiert, die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und die mtDNA durch Zusatz von 400 µl Isopropanol und 40 µl 5 M Ammoniumacetat über Nacht bei -20°C präzipitiert. Nach 5 min Zentrifugation mit 13000 U/min wurde die mtDNA pelletiert und in 100 µl "50-10"TE-Puffer resuspendiert.

Danach erfolgte die Zusammenführung mehrerer Aliquots zu einem Volumen von 500 µl und ein RNA-Abbau durch Zugabe von RNase A (100 µg/ml Endkonzentration) für 1 h bei 37°C. Die erneute Präzipitation der mtDNA erfolgte wie oben beschrieben, das DNA-Pellet wurde

in 100 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentrationsbestimmung wurde wie bei der Gesamt-DNA durchgeführt. Alle zur mtDNA-Isolierung verwendeten Puffer sind in Anhang A aufgeführt.

c) Restriktion, Elektrophorese und Blotting

Für die Hybridisierungsversuche wurden 5 µg Gesamt- oder mtDNA mit 5 U Restriktionsenzym unter Zugabe der entsprechenden Reaktionspuffer für mindestens 4 h bei 37°C restringiert. Als Restriktionsenzyme wurden die Endonukleasen *Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RV, *Xba*I, *Dra*I und *Hae*III (Fa. Gibco BRL, Eggenstein) verwendet.

Die DNA-Fragmente wurden nach Zugabe von 5x Ladepuffer in einem 1%-Agarosegel für 6-8 h bei 50-60 V in 1x-TAE-Puffer aufgetrennt und anschließend in einer Ethidiumbromidlösung (0,1 mg/ml) angefärbt. Die Fragmentgrößenbestimmung erfolgte mit Hilfe eines DIG-markierten DNA-Längenstandards (Fa. Roche, Granzach-Wyhlen).

Anschließend wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Fa. Roche) durch Kapillarblot übertragen. Der Transfer erfolgte über Nacht, als Transfermedium diente eine 20 x SSC-Lösung.

Nach dem DNA-Transfer wurden die Filter in 2x-SSC (10 min) gewaschen und bis zur Hybridisierung feucht in Plastikfolie eingeschweißt. Zur Fixierung der DNA erfolgte eine UV-Bestrahlung (30 s; 0,120 J/cm²).

d) Beschreibung der Sonden

Die Primer zur Amplifikation der benötigten Gensonden wurden aus cDNA-Sequenzen des mitochondrialen Genoms von *Arabidopsis thaliana* nach Datenbankrecherche (EMBL; ID Miatgen) abgeleitet. Dabei wurden unterschiedliche Gene, welche für ribosomale Proteine und Untereinheiten der Proteinkomplexe der Atmungskette kodieren, ausgewählt (siehe Tabelle 5).

Zur Kontrolle auf Kontamination isolierter mtDNA mit genomischer DNA wurde eine ubiquitäre kerngenomische cDNA-Gensonde (Actin) verwendet. Die Primer wurden von bekannten Actin-cDNA-Sequenzen aus Reis abgeleitet; die Amplifikation erfolgte aus Roggenpollen-cDNA.

e) Herstellung der Sonden

Die Primerpaare zur Amplifizierung der eingesetzten Sonden wurden aus cDNA-Sequenzen der entsprechenden Gene mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO 5.0 abgeleitet (siehe Tabelle 6). Die Markierung der Sonden erfolgte durch den Einbau von Digoxigenin-dUTP (Fa. Roche) während der PCR-Reaktion mit einem Thermocycler, Modell UNO, der Fa. Biometra (Göttingen).

Die Reaktionsparameter sind in den Tabellen 7 und 8 angegeben.

f) Nichtradioaktive Southern-Hybridisierung

Für die nichtradioaktive Southern-Hybridisierung wurde das DIG-System der Fa. ROCHE verwendet. Die Reaktion erfolgte in Hybridisierungsröhren in einem Hybridisierungssofen (Fa. Stuart Scientific, Staffordshire, UK). Die Prähybridisierung von 1-2 Filtern je Röhrchen wurde in 20 ml DIG-Easy-Hyb (Fa. Roche) für mindestens 1 h durchgeführt. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung gegen neue, die markierte Sonde enthaltende Hybridisierungslösung ausgetauscht. Vor Zugabe der Sonde wurde diese für 10 min im Wasserbad (100°C) denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Je ml Hybridisierungslösung wurden 2-5 µl markierte Sonden-DNA eingesetzt. Hybridisiert wurde für mindestens 15 h bei 39°C. Die Detektierungsreaktion erfolgte nach Protokollen der Fa. Roche. Die Exposition der Röntgenfilme betrug, in Abhängigkeit von der Signalstärke, zwischen 10 min und 2 h. Die Rehybridisierung der Filter erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die

Sondenlösungen wurden bei -20°C gelagert und nach Denaturierung bei 68°C im Wasserbad für weitere 8 bis 10 Hybridisierungen verwendet.

Beispiel 4:

Nachweis mt-spezifischer Signale nach Hybridisierung von Gesamt-DNA

Zunächst wurde geklärt, ob die Verwendung von Gesamt-DNA in Verbindung mit den mitochondrialen Sonden nicht zu anderen oder zusätzlichen Hybridisierungssignalen führen kann, welche auf das Vorhandensein mitochondrialer Sequenzen im Kerngenom zurückzuführen sein könnten. Aus diesem Grund wurde aus frisch geernteten Blattproben der zu untersuchenden Pflanzen CMS-1 (N), CMS-1 (S), MSL-163 (N) und MSL-163 (S) jeweils mitochondriale DNA isoliert und die Hybridisierungsergebnisse mit denen unter Verwendung von Gesamt-DNA verglichen. Nach Restriktion von Gesamt- und mtDNA der gleichen Linie mit dem Restriktionsenzym *Hind*III und elektrophoretischer Auftrennung der Proben im Agarosegel konnte nach Ethidiumbromidfärbung visuell keine DNA nachgewiesen werden. In den Spuren mit Gesamt-DNA war eine kontinuierliche Fragmentverteilung im Größenbereich von ca. 1 bis 23 kb zu beobachten, was auf eine vollständige Restriktion der DNA hinweist (siehe Abbildung 2A).

Nach Hybridisierung mit der mt-Gensonde *nad9* und mtDNA bzw. Gesamt-DNA als Template konnten identische Hybridisierungssignale nachgewiesen werden. Das Ergebnis zeigt, daß unter Verwendung von mt-Gensonden und Gesamt-DNA als Template mtDNA-spezifische Signale nachgewiesen werden können (siehe Abbildung 2B).

Im Vergleich dazu konnte unter Verwendung einer cDNA-Sonde des kernkodierten Actingens gezeigt werden, daß keine Kontamination der mtDNA mit genomischer DNA vorliegt, da wie erwartet nur in den Spuren mit Gesamt-DNA Hybridisierungssignale nachzuweisen waren

(siehe Abbildung 2C). Da somit die mt-DNA-Spezifität der Sonden gegeben war, wurde im weiteren Gesamt-DNA verwendet.

Für die eingehenden molekularbiologischen Untersuchungen wurde das Pflanzenmaterial in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe bestand aus der CMS-Vergleichslinie CMS-1 (S) und dem zugehörigen Maintainer CMS-1 (N), die zweite Gruppe beinhaltete die männlich sterilen MSL-Linien MSL-163 (S) und MSL-19 (S) und zugehörige männlich fertile Maintainerlinien MSL-163 (N) und MSL-19 (N).

Insgesamt wurden 34 verschiedene Sonden/Enzym-Kombinationen getestet, von denen 14 eine Unterscheidung der männlich sterilen Linien (S) zu den jeweils zugehörigen Maintainern (N) möglich machten (siehe Tabelle 9).

Des weiteren konnten die (S)-Plasmen der beiden Gruppen CMS und MSL insbesondere unter Verwendung der Sonde *nad9* in Kombination mit verschiedenen Restriktionsenzymen eindeutig differenziert werden (siehe Tabelle 10).

Mit der Sonden/Enzym-Kombination *nad9/DraI* wurde anschließend ein erweitertes Set von verfügbaren *Lolium*-CMS-Quellen in die Untersuchungen integriert: drei Pflanzen der CMS-Inca Quelle (CMS-I1, CMS-I2, CMS-I3, CMS-I4), CMS-113, CMS-114, CMS-115, CMS-117, CMS-118 und CMS-119 (siehe Abbildung 3). Hierbei konnten die MSL-Pflanzen MSL-163 und MSL-19 eindeutig von allen anderen CMS-Quellen unterschieden werden, die ihrerseits untereinander ein identisches Bandenmuster aufwiesen.

Abbildungen

Abbildung 1: A, Pollen einer Einzelpflanze CMS-1 (S) nach KES-Färbung; B, Pollen einer Einzelpflanze CMS-1 (N) nach KES-Färbung (Vergrößerungsmaßstäbe nicht identisch).

Abbildung 2: A, Restriktionsverdau von Gesamt-DNA (a) und mtDNA (b) der Pflanzen MSL-19, MSL-163 und CMS-1 mit dem Restriktionsenzym *HindIII*; B, Southern-Hybridisierung mit der Sonden/Enzymkombination *nad9/HindIII*; C, Southern-Hybridisierung mit der Sonden/Enzymkombination *Actin/HindIII*; (S) = CMS-Pflanze; (N) = Maintainer.

Abbildung 3: Southern-Hybridisierung (Sonden/Enzymkombination *nad9/DraI*) von DNA-Bulks der Pflanze Inca (CMS-I1, CMS-I2, CMS-I3, CMS-I4) und der CMS-1 (S), MSL-163 (S) und MSL-19 (S) und von Einzelpflanzen der Herkünfte CMS-113, CMS-114, CMS-115, CMS-117, CMS-118 und CMS-119.

Tabelle 1: Färbemethoden zum Pollen-Vitalitätstest

Methode zur Differenzierung von fertilem und sterilem Pollen	(ALEXANDER, 1969)
Färbung:	
fertiler Pollenkörner	dunkel lila
steriler Pollenkörner	Hellgrün
Zusammensetzung der Lösung:	
Äthylalkohol	10ml
Malachitgrün (1% in 96% Alkohol)	1ml
dest. Wasser	50ml
Glycerin	25ml
Phenol	5g
Chloralhydrat	5g
Fuchsin (1% in Wasser)	5ml
Orange G (1% in Wasser)	0,5ml
Eisessig (pH 3,2)	1-2ml
Lichtgrün	(ŠINSKA, 1976)
Färbung:	
fertile Pollenkörner	Tiefgrün mit deutlich netzartiger Oberflächenstruktur
sterile Pollenkörner	meist völlig farblos und durch degeneriertes Plasma schwach grün gefärbt
Zusammensetzung der Lösung:	
Glycerin	1 Teil
Milchsäure	1 Teil
Phenol	1 Teil
Lugolsche Lösung	
Färbung:	
Fertile Pollenkörner	Rotfärbung
Zusammensetzung der Lösung:	
Jod-Jod-Kalium	

Tabelle 2: Merkmalsausprägungen von Kreuzungsnachkommen der CMS-Linie MSL-19 und CMS-1 (beide *Lolium perenne*)

Merkmal	MSL-19	CMS-1
Ploidiestufe	diploid	diploid
Entstehung	experimentelle Mutagenese mit N-Ethylharnstoff	Spontan (1969 u. 1970 in Sortimenten u. Vermehrungsbeständen in Gülzow gefunden; BURKERT u. SCHLENKER, 1975)
Visuelle Sterilität	sehr gut	Sehr gut
Antherenausprägung	weiß-grün-gelbsteril bzw. Mischfarben	Weiß-grün-gelbsteril Bzw. Mischfarben
Visuelle Sterilität/ Sterilitätsgrad	gute Übereinstimmung unabhängig von der Antherenausprägung	Keine Übereinstimmung hoher Anteil Teilsteriler in Abhängigkeit von der Antherenausprägung
Umweltabhängigkeit	sehr niedrig	Hoch

Tabelle 3: Anteil vollsteriler Genotypen in F₁-Kreuzungsnachkommenschaften bei *Lolium perenne* in Abhängigkeit von der CMS-Quelle

CMS-Quelle (S)	Entstehungsweise	Anzahl untersuchter visuell steriler F ₁ -Pflanzen nach Rückkreuzung mit Maintainer (N)	relativer Anteil vollsteriler Pflanzen
CMS-1	spontan	1333	53,3 ^{x)}
CMS-INCA	Interspezifische Kreuzung	172	47,7 ^{x)}
CMS-5 B (Irland)	Interspezifische Kreuzung	225	77,0 ^{xx)}
MSL-19	Mutagenese mit N-Ethylharnstoff	1500	99,0 ^{xxx)}

x) Nachweis Färbemethode Lichtgrünreagenz

xx) nach Conolly (1984) Sterilitätstyp 1 und 2^v

xxx) Nachweis Färbemethode Alexander

v Sterilitätstyp 1: Antheren sind flach, platzen nicht auf, sind zusammengeschrumpft, meist weiß oder durchsichtig mit dünnen Zellwänden. Die Antheren enthalten keinen Pollen.

Sterilitätstyp 2: Antheren platzen nicht auf und zusammengeschrumpft, jedoch nicht so flach wie 1, Antheren enthalten keinen lebensfähigen Pollen, leere Pollen sind z.T. sehr schwach gefärbt.

Tabelle 4: Sterilitätsvererbung der *Lolium perenne* CMS-Linien MSL-19 und CMS-1;
Ergebnisse der Sterilitätsüberprüfung an F₁-Material mit identischen Bestäubern
(Maintainern)

Kreuzungskombination CMS (S) x Bestäuber (N)	Anzahl untersuchte F ₁ -Pflanzen	Ergebnisse Sterilitätsprüfung (Relativwerte)	
		visuelle Sterilität	Pollenvitalität ^x
MSL-19 x 85/5/9/6	30	100	0
MSL-19 x KE 23/85	35	100	0
CMS-1 x 85/5/9/6	30	100	15,20
CMS-1 x KE 23/85	30	100	13,80

^x nach Färbemethode von Alexander (siehe oben)

Tabelle 5: Funktion der verwendeten mitochondrialen Gene bei höheren Pflanzen

Protein	Mitochondriales Gen
Untereinheiten der Cytochrom C-Oxidase	<i>coxI, coxII, coxIII</i>
NADH-Dehydrogenase	<i>nad6</i>
NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase	<i>nad9</i>
Ribosomale Proteine: große Untereinheit	<i>rpl6</i>
Kleine Untereinheit	<i>rps3</i>
Apocytochrom b	<i>cob</i>
Cytochrom C Biogenese ORF 206	<i>ccb206</i>

Tabelle 6: Beschreibung der verwendeten Primerpaare (U = oberer Primer; L = unterer Primer)

Sonde	Primer (5'- 3')	Annealing- temperatur	Amplicon (bp)
<i>coxI</i>	TTACTTCACATAGCTTTTCGTU U CCACAAACCACAAGGATATAG L	52.1°C	1556
<i>coxII</i>	CGTAAAGGCATGATTAGTTCC U GATTGTTCTAAAATGGTTATTCCTC L	52.3°C	697
<i>coxIII</i>	ATGATTGAATCTCAGAGGCAT U CATATACCTCCCCACCAATAG L	53.0°C	797
<i>nad6</i>	TTAGTAGATCGTGAGTGGGTC U GTGCTAAAAATCCGGTACAT L	51.6°C	563
<i>nad9</i>	TTATCCGTCGCTACGCTGTTC U AATGGAAAGATCGGAACATGG L	55.0°C	3392
<i>rpl5</i>	ATGTTTCCACTCAATTTTCAT U GCTCCACAGTGGTAAAGTCT L	52.2°C	522
<i>rpl6</i>	TTACGACCACTGAACAAACTT U TTTAACCATAAAAATCGATTATGC L	53.0°C	535
<i>rps3</i>	CTATATTTTCGTACGTTTCGGA U TTATTATGGTAAATTTGTGTATCAA L	52.4°C	1594
<i>cob</i>	ATGACTATAAGGAACCAACGA U GATCAGTCTCATCCGTGTAA L	52.1°C	1174
<i>ccb206</i>	ATGAGACGACTTTTTCTTGAA U CTTGTAATAACTAATCGAGACCG L	52.2°C	616
Actin	CACACTGTCCCCATCTATGAA U CTCTTGGCTTAGCATTCTTGG L	57.9°C	650

Tabelle 7: PCR-Bedingungen zur Erzeugung der genutzten DNA-Sonden

PCR-Komponenten	Menge
DIG-dUTP (10x)	5µl
d-NTP-Mix (10mM)	1µl (200µM)
Primer (5µM)	Je 2,5µl (je 0,25µM)
Taq-Polymerase* (5U/µl)	0,15µl (0,75 U)
10x-Reaktionspuffer	5µl
MgCl ₂ -Lösung (50mM)	1,55µl (1,5µM)
H ₂ O	17,3µl
Template-DNA	15µl (75ng)
	Reaktionsvolumen 50µl

*Silverstar, Fa. Eurogentec

Tabelle 8: PCR-Bedingungen (30 Zyklen 2.-4.)

1.	Denaturierung (einmalig)	94°C	2min
2.	Denaturierung	94°C	1min
3.	Annealing	s. Tab. 6	1min
4.	Extension	72°C	2min
5.	Extensionsverlängerung (einmalig)	72°C	2min

Tabelle 9: Differenzierung zwischen (S)- und (N)-Cytoplasma der Pflanzen MSL-19 und MSL-163 (MSL) im Vergleich zur Pflanze CMS-1 (CMS)

mt-Gensonde	Restriktionsenzym					
	<i>Hind</i> III	<i>Xba</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Eco</i> RV	<i>Bam</i> HI	<i>Hae</i> III
	MSL CMS	MSL CMS	MSL CMS	MSL CMS	MSL CMS	MSL CMS
<i>coxI</i>	+ +	n. g.	+ +	n. g.	+ +	n. g.
<i>coxIII</i>	+ +	n. g.	+ +	+ +	+ +	n. g.
<i>nad6</i>	+ +	n. g.	+ +	- -	+ +	- -
<i>nad9</i>	- +	- +	+ +	- +	+ +	- +
<i>ccb206</i>	- -	- -	- -	+ -	- -	- -
<i>rpl5</i>	- -	n. g.	n. g.	- -	n. g.	n. g.
<i>rpl6</i>	+ -	- -	+ +	n. g.	+ -	n. g.
<i>cob</i>	n. g.	+ -	n. g.	+ -	n. g.	+ -
<i>rps3</i>	n. g.	n. g.	n. g.	+ +	n. g.	n. g.

MSL = DNA Bulk der Pflanzen MSL-19 und MSL-163

CMS = männlich sterile Pflanze CMS-1

+ = Differenzierung zwischen (N)- und (S)-Cytoplasma möglich

- = Differenzierung zwischen (N)- und (S)-Cytoplasma nicht möglich

n. g. = nicht getestete Sonden-/Enzymkombinationen

Tabelle 10: Hybridisierungsmuster der (S)-Cytoplasmen der Pflanzen MSL-19 und MSL-163 (MSL) im Vergleich zur Pflanze CMS-1 (CMS)

mt-Gensonde	Restriktionsenzym					
	<i>Hind</i> III	<i>Xba</i> I	<i>Dra</i> I	<i>Eco</i> RV	<i>Bam</i> HI	<i>Hae</i> III
	MSL CMS	MSL CMS	MSL CMS	MSL CMS	MSL CMS	MSL CMS
<i>CoxI</i>	1 2	n. g.	1 2	n. g.	1 1	n. g.
<i>coxIII</i>	1 2	n. g.	1 2	1 2	1 1	n. g.
<i>nad6</i>	1 2	n. g.	1 1	1 1	1 2	1 1
<i>nad9</i>	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2	1 2
<i>ccb206</i>	1 1	1 1	1 1	1 2	1 1	1 1
<i>rpl5</i>	1 1	n. g.	n. g.	1 1	n. g.	n. g.
<i>rpl6</i>	1 1	1 1	1 1	n. g.	1 1	n. g.
<i>cob</i>	n. g.	1 2	n. g.	1 1	n. g.	1 2
<i>rps3</i>	n. g.	n. g.	n. g.	1 1	n. g.	n. g.

MSL = Pflanzen MSL-19 und MSL-163

CMS = männlich sterile Pflanze CMS-1

n. g. = nicht getestet

Gleiche Zahlen innerhalb einer Sonden-/Enzymkombination bezeichnen identische Hybridisierungsmuster.

Anhang A

Isolation von Gesamt-DNA:

2xCTAB

0.1 M Tris/HCl pH 8.0

1.4 M NaCl

0.5 M EDTA pH 8.0

2% CTAB

0.04 M β -Mercaptoethanol

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8.0

1 mM EDTA pH 8.0

Isolation von mtDNA

Extraktionspuffer 1

0.44 M Sucrose

50 mM Tris pH 8.0

3 mM EDTA pH 8.0

0.5% BSA

10 mM β -Mercaptoethanol

DNase-Puffer

0.44 M Sucrose

50 mM Tris pH 8.0

10 mM MgCl_2

Waschpuffer

0.6 M Sucrose

25 mM EDTA pH 8.0

50 mM Tris pH 8.0

Lysispuffer

50 mM Tris

20 mM EDTA

0.5% SDS

pH 8.0

Extraktionspuffer 2

0.15 M Tris
0.1 M NaCl
80 mM EDTA
1.5% SDS
pH 8.0

"50-10" TE-Puffer

50 mM Tris
10 mM EDTA
pH 8.0

TE-Puffer

10 mM TRIS
1 mM EDTA
pH 8.0

Elektrophorese und Blotting

1x TAE
40 mM Tris/Acetate
1 mM EDTA

20x SSC
3 M NaCl
0.3 M Na-Citrat
pH 7.0

5x Ladepuffer

12.5 % Ficoll
62.5 mM EDTA pH 8.0
0.5 % SDS
5x TAE
0.02 % Bromphenol Blau
0.02 % Xylene Cyanol

A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zur Herstellung von vollständig männlich sterilen Pflanzen der Gattung *Lolium*, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Mutagenese von Karyopsenmaterial von Wildtyppflanzen der Gattung *Lolium*;
- b) gegebenenfalls Untersuchung der mutagenisierten *Lolium*-Pflanzen mit auf die Pollenvitalität gerichteten Testmethoden und/oder mit molekularbiologischen Methoden; und
- c) Identifizierung von vollständig männlich sterilen *Lolium*-Pflanzen.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß Mutagenese durch Zugabe von chemischen Mutagenen, insbesondere von N-Ethylharnstoff erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß die *Lolium*-Pflanzen ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* und *Lolium hybridum*.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die auf Pollenvitalität gerichteten Testmethoden Färbemethoden sind.

5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet, daß die Färbemethode ausgewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus der Methode nach Alexander, der Zugabe von Lichtgrünreagenz sowie der Zugabe von Lugolscher Lösung.

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die molekularbiologischen Methoden zur Untersuchung der mutagenisierten *Lolium*-Pflanzen Southern-Blot-Techniken sind.

7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet, daß die Primerpaare zur Amplifizierung der bei der Southern-Blot-Hybridisierung eingesetzten Sonden aus der Gruppe, bestehend aus den folgenden Primerpaaren ausgewählt werden:

- a) TTACTTCACATAGCTTTTCGTU
CCACAAACCACAAGGATATAG
- b) CGTAAAGGCATGATTAGTTCC
GATTGTTCTAAAATGGTTATTCCTC
- c) ATGATTGAATCTCAGAGGCAT
CATATACCTCCCCACCAATAG
- d) TTAGTAGATCGTGAGTGGGTC
GTGCTAAAAATCCGGTACAT
- e) TTATCCGTCGCTACGCTGTTC
AATGGAAAGATCGGAACATGG
- f) ATGTTTCCACTCAATTTTCAT
GCTCCACAGTGGTAAAGTCT
- g) TTACGACCACTGAACAAACTT
TTTAACCATAAAATCGATTATGC
- h) CTATATTTTCGTACGTTTCGGA
TTATTATGGTAAATTTGTGTATCAA
- i) ATGACTATAAGGAACCAACGA
GATCAGTCTCATCCGTGTAA
- j) ATGAGACGACTTTTTCTTGAA
CTTGTAATAACTAATCGAGACCG,

- k) Primerpaare entsprechend den in a) bis j) angegebenen Primerpaaren, wobei sich die jeweiligen Primersequenzen von den in a) bis j) angegebenen Sequenzen jeweils um höchstens 3 Basen unterscheiden, und
- l) Primerpaare entsprechend den in a) bis k) angegebenen Primerpaaren, wobei die jeweiligen Primersequenzen die in a) bis k) angegebenen Sequenzen umfassen, wobei die Sequenzen in 5'-3'-Richtung angegeben sind und jeweils die erste Sequenz den oberen Primer darstellt.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet, daß die Restriktionsenzyme ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus *HindIII*, *XbaI*, *DraI*, *EcoRV*, *BamHI* und *HaeIII*.

9. Pflanzen der Gattung *Lolium* mit vollständiger männlicher Sterilität, hergestellt gemäß dem Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche.

10. Verfahren zur Herstellung von stabilen F1-Hybriden vollständig männlich steriler Pflanzen der Gattung *Lolium*, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Herstellung von vollständig männlich sterilen Pflanzen der Gattung *Lolium* (MSL-Pflanzen) gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, und
- b) Rückkreuzung der in Schritt a) erhaltenen MSL-Pflanzen mit Pflanzen der Gattung *Lolium*, die ein normal fertiles Cytoplasma tragen und die Sterilität der MSL-Pflanzen nicht aufheben (Maintainer-Pflanzen).

11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß als Maintainer-Pflanzen **Pflanzen der entsprechenden Art verwendet werden, die nach Kreuzung mit der MSL-Linie eine 100% pollensterile Nachkommenschaft ergeben.**

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
dadurch gekennzeichnet, daß eine mehrfache Rückkreuzung mit Maintainer-Pflanzen erfolgt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12,
dadurch gekennzeichnet, daß das sterilitätsinduzierende Plasma der in Schritt a) hergestellten MSL-Pflanze durch Polyploidisierung in eine vorzugsweise tetraploide Genomstufe gebracht wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet, daß die Polyploidisierung durch Behandlung mit Colchicin erfolgt.

15. Stabile männlich sterile Linie von vollständig männlich sterilen Pflanzen der Gattung *Lolium*, hergestellt gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14.

16. Verwendung der vollständig männlich sterilen Pflanzen der Gattung *Lolium* nach Anspruch 15 zur Erzeugung von Hybriden mit Bestäuber-Pflanzen mit normaler männlicher Fertilität.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von stabil männlich sterilen Pflanzen der Gattung *Lolium* und deren Verwendung für die gezielte Produktion von Hybridsorten unter Ausnutzung von Heterosis.

Abbildung 1

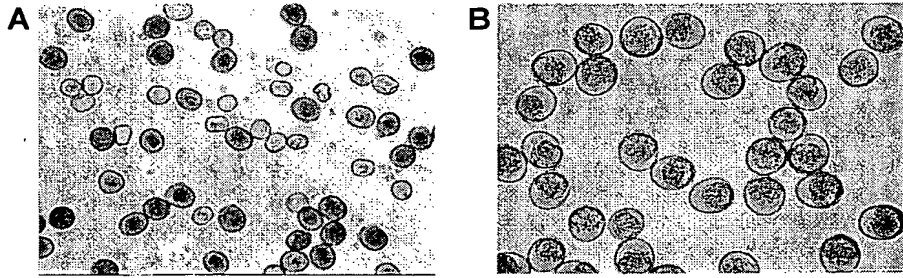


Abbildung 2

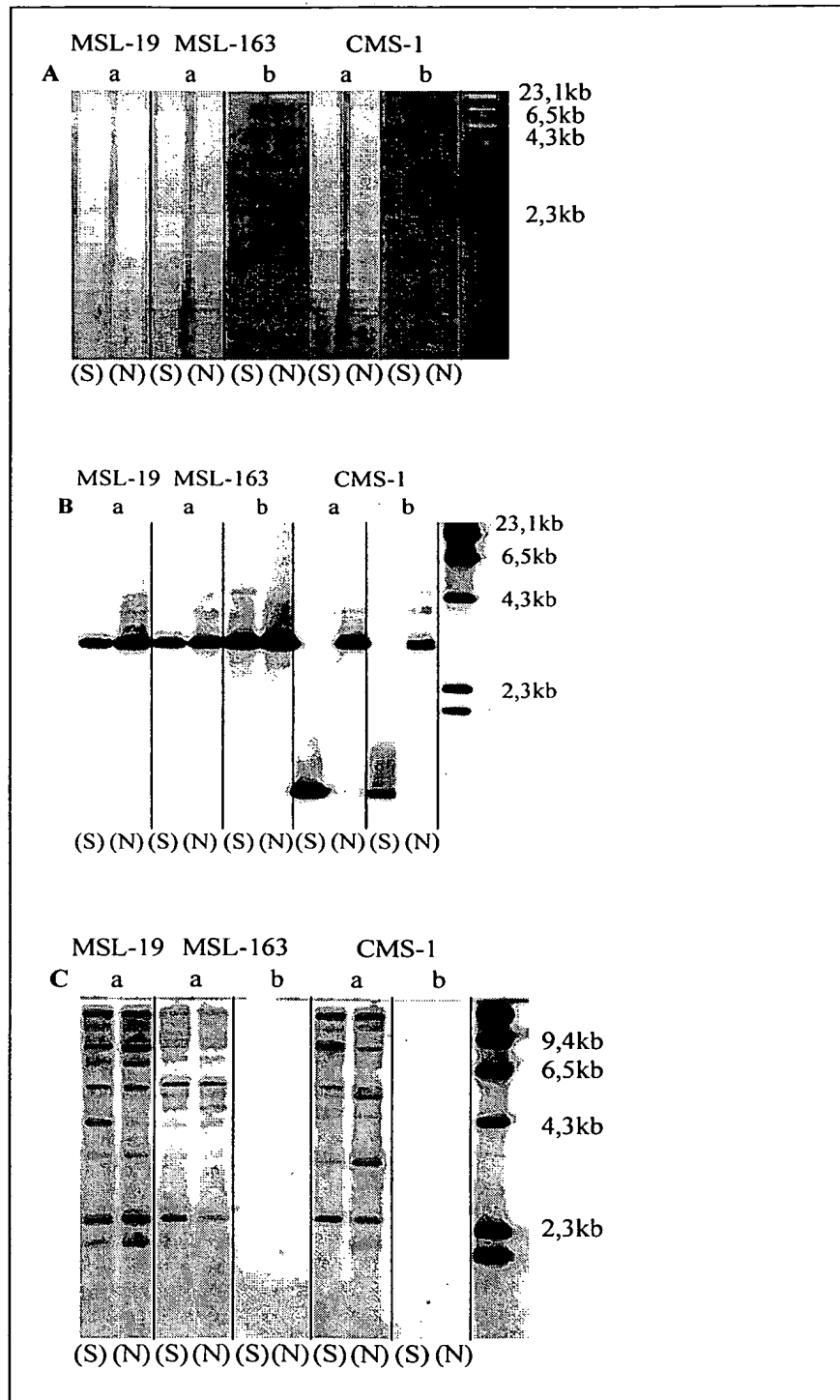
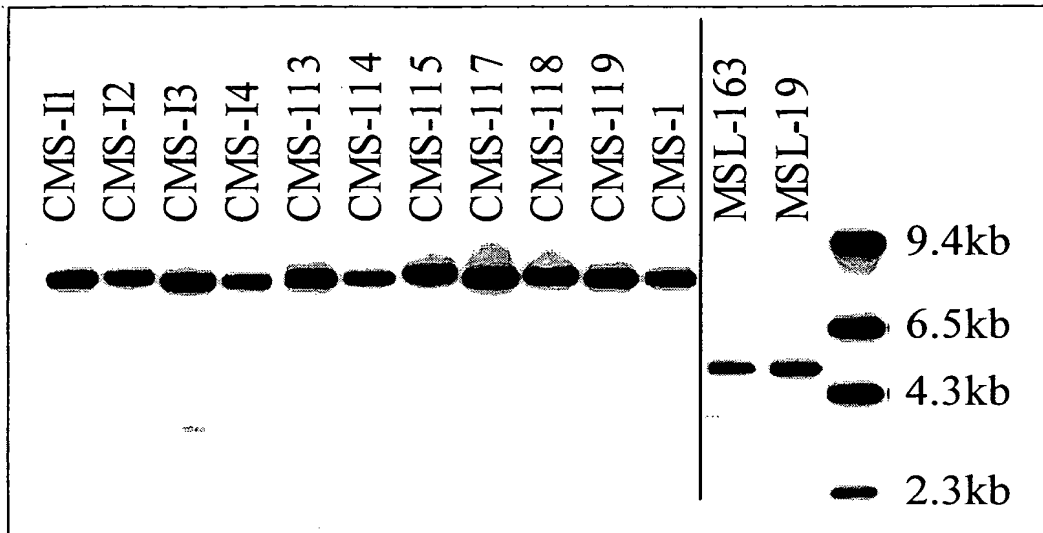


Abbildung 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.